Über den Einfluß von wäßrigen Herbstlaubauszügen auf Wachstum und Tätigkeit cellulose-zersetzender Mikroorganismen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Eberhard Sening
aus Dießen-Ammersee

Juli 1962

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt i. Thür.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Bukatsch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1962

Abdruck aus dem
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten
und Hygiene. II. Abteilung
Herausgegeben von Prof. Dr. Richard Koch, Berlin,
Prof. Dr. Georg Müller, Leipzig,
und Oberregierungsrat Dr. C. Stapp, Braunschweig.
VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA
Satz und Druck: Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (V/14/7)
Printed in Germany
Veröffentlicht unter der Lizenznummer 1063

Über den Einfluß von wässerigen Herbstlaubauszügen auf Wachstum und Tätigkeit cellulosezersetzender Mikroorganismen

Eberhard Sening

Mit 5 Abbildungen im Text

Einleitung

Als den wichtigsten Prozeß bei der Verrottung von Pflanzenresten und der anschließenden Humifizierung sieht man seit langem den Abbau der Cellulose durch aerobe und anaerobe Bakterien sowie durch Pilze und Actinomyceten an. Als erste erhielten OMELIANSKY sowie HUTCHINSON und CLAYTON Kulturen jener im Kohlenstoffkreislauf wichtigen Organismen. Eine Reinkultur von Cellulosezersetzern konnten aber bisher nur wenige Autoren erhalten.

Von den bis heute bekannten fakultativen und obligaten Zersetzern ist die obligate Gruppe nach übereinstimmender Meinung der führenden Autoren von ausschlaggebender Bedeutung für den Kohlenstoffkreislauf. In dieser Gruppe nun finden wir in *Sporocytophaga myxococcoides* einen Organismus allgemeiner Verbreitung und hoher Zersetzungsleistung.

Der natürliche Celluloseabbau geht bekanntlich nicht an allen Standorten gleichmäßig vor sich, sondern ist stark von Bodenart und -reaktion, die über das Populationsbild entscheiden, abhängig.

Die Frage nun, inwieweit Wirkstoffe, die mit den zu verrottenden Pflanzenresten in den Boden gelangen, ebenfalls Einfluß auf den Celluloseabbau nehmen können, soll Gegenstand dieser Arbeit sein. Erste Untersuchungen über die Zersetzung verschiedener Waldstreuarten stammen von STAPP und BORTELS (1934). MELIN (1946) untersuchte die Streu einer Reihe von Waldbäumen und konnte vielfach eine stark fungistatische Wirkung feststellen. BENDZ gelang 1958 die Isolierung von Gallussäure aus Herbstlaub von *Acer platanoides*. Er befaßte sich außerdem mit dem Einfluß dieses Stoffes auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus*. SÄURIG und BUKATSCH studierten den Einfluß von Herbstlaubauszügen auf *Azotobacter chroococcum* und konnten eine Reihe von Stoffen feststellen, die auch in dieser Arbeit als wirksame Bestandteile gegenüber Cellulosezersetzern gefunden wurden. Es ist jedoch bei der Frage einer Beeinflussung des Celluloseabbaus durch Wirkstoffe höherer Pflanzen zu bedenken, daß gerade die klassischen Vertreter innerhalb der Gruppe der aeroben Cellulosezersetzer, die Vibrionen, Cytophagen und Sporocytophagen, nur reine, nicht aber inkrustierte Cellulose, wie sie meist auftritt, angreifen können. So gelang es KÜHLWEIN und GALLWITZ in elektronenoptischen Untersuchungen zu zeigen, daß inkrustierte Cellulosewände gegen einen Angriff von Myxococcen völlig immun sind.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Material und Methodik

1. Versuchsorganismen

Als Versuchsorganismus fand eine Reinkultur von *Sporocytophaga myxococcoides* aus der American Type Culture Collection Verwendung (ATCC 10010) sowie eine selbst isolierte nicht völlig reine Kultur derselben Species. In Vorversuchen wurde ferner der Stamm B 490, ebenfalls *S. myxococcoides*, aus dem Institut Pasteur benutzt[1]). Abb. 1, 2 und 4 zeigen die typischen Langstäbchen von *S. myxococcoides* in einer Mikroaufnahme, Abb. 3 die Mikrocysten unseres Versuchsorganismus.

2. Kulturmethoden

Als Grundnährlösung diente das von Bortels speziell für Cytophagen erarbeitete Medium mit folgender Zusammensetzung:

$NaNO_3$	2,0 g	$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$	50 mg
KH_2PO_4	0,6 g	$CaCl_2$	20 mg
K_2HPO_4	0,3 g	$MnSO_4$	10 mg
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,5 g	Aqua dest.	1000 ml
Erdextrakt	1%		

Diese Nährlösung diente zur Herstellung von Flüssigkeits- und Agarkulturen.

2.1 Flüssigkeitskulturen

Etwa 5 ml Nährlösung wurden im Reagenzglas mit einem Filtrierpapierstreifen, der zu ungefähr einem Viertel seiner Länge in die Nährlösung eintauchte, im Autoklaven bei 1,5 atü 20′ sterilisiert. Diese Ausführung hatte jedoch den Nachteil, daß nur ungefähr 10% der zugefügten Papiermenge zersetzt wurden. Die stark aeroben und sehr feuchtigkeitsliebenden Cellulosezersetzer entwickelten sich nämlich nur in Höhe des Flüssigkeitsspiegels und etwa 2—3 cm darüber. Eine möglichst weitgehende Zerstörung der Cellulose hingegen konnte in folgender Weise erreicht werden.

Rundfilter wurden auf hitzeverträglichen Kunststoffnetzen (Sterilisation!) ausgelegt und die Nährlösungsmenge so bemessen, daß die Flüssigkeitsoberfläche gerade das Papier erreichte. Nach Ablauf von 10 Tagen war das Papier in der Regel gänzlich zerstört.

Abb. 5 zeigt den Querschnitt einer solchen Rundfilterflüssigkeitskultur. Links sind das Substrat und seine Unterlage, das Kunststoffnetz, dargestellt. Das Netz liegt auf Glasstreifen, die zu U-Winkeln umgebogen sind. Rechts ist die Höhe der Nährlösung eingezeichnet.

Diese Kulturmethode fand vor allem bei den Atmungsmessungen nach der Isermeyerschen Methode Verwendung.

Besonders zur Bereitstellung größerer Mengen von Impfgut für Dichtsaaten haben sich Kulturen auf Cellulosepulver, das in 1%iger Konzentration in Nährlösung suspendiert war, als sehr geeignet erwiesen (Cellulosepulver für chromatographische Zwecke von Riedel de Haen). Als Kulturgefäße dienten 500 ml Fernbachkolben, die auf einer Schüttelmaschine standen.

2.2 Agarkulturen

Die Weiterzüchtung der Testorganismen erfolgte auf Celluloseagar. Er enthielt 1% Cellulosepulver, 1% Agar (in Stangenform) sowie das Nährmedium nach Bortels. Da er Hemmstoffe enthalten konnte, wurde das Agar vor dem Ansetzen des Nährbodens einige Tage im Wasser ausgefault.

3. Blattsorten

Das Herbstlaub folgender einheimischer Laubbäume diente als Versuchsmaterial:

Carpinus betulus, Quercus robur, Fagus silvatica, Acer platanoides, Aesculus hippocastanum, Tilia ulmifolia, Betula pendula.

[1]) Die Überlassung des Stammes verdanken wir Herrn Prof. Dr. Pochon, Paris.

Abb. 1. Langstäbchen

Abb. 2. Langstäbchen

Abb. 3. Mikrocysten

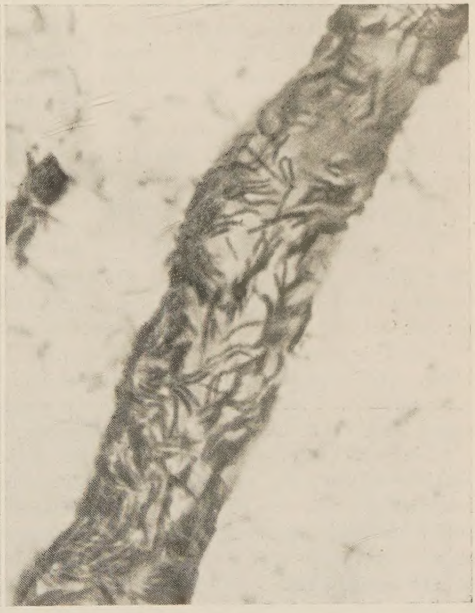


Abb. 4. Langstäbchen

Sporocytophaga myxococcoides (ATCC 10010) auf Cellulosepartikeln, Färbung mit Karbolfuchsin, Phasenkontrastaufnahme. Gesamtvergrößerung etwa 1300 × (phot. E. Sening)

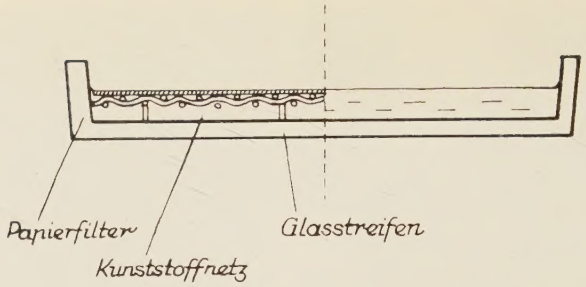


Abb. 5. Anordnung für Rundfilterflüssigkeitskultur

Das Herbstlaub der erwähnten Arten wurde nach dem ersten starken Laubfall, ohne daß vorher Regenfälle eingetreten waren, am Boden gesammelt. Alle Blätter stammten jeweils von einem Baum aus Diessen am Ammersee. Nur von *Aesculus* wurde auch das Laub eines Baumes aus München untersucht. Da die Kastanienblätter aus München und Dießen verschieden wirkten, wurde das Münchener Laub mit $Index_1$, das Diessener Laub mit $Index_2$ versehen. Das Blattmaterial lagerte zur weiteren Verwendung kühl und lufttrocken.

4. Extraktion

Die Blattauszüge wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen hergestellt: 5- und 10%ig. Für 5%ige Extrakte wurden 10 g lufttrockenes Blattmaterial mit 200 ml Aqua dest. im Mixgerät zermahlen, für 10%ige Auszüge nahmen wir 20 g Herbstlaub auf 200 ml Aqua dest. Der erhaltene Brei blieb 24 Std. stehen, worauf Bodensatz sowie Trübungen abzentrifugiert wurden. Fanden die Extrakte für Atmungsversuche Verwendung, so mußten sie unter Benutzung einer Seitz-Druckfilteranlage entkeimt werden. Mit Klärscheibe Nr. 7 wurde zunächst vorgeklärt, in einem zweiten Arbeitsgang mit Serumfilter EKS sterilisiert. Um bei den Atmungstesten eine allzu starke Verdünnung des Nährmediums bei Zugabe der Auszüge zu vermeiden, wurden die Extrakte unter Verwendung einer Ausfrieranlage im Vakuum eingeengt. Die Konzentrierung erfolgte bei 5%igen Auszügen im Verhältnis 1 : 10, bei 10%igen im Verhältnis von 1 : 5, so daß im eingeengten Extrakt die Wirkstoffe von beispielsweise 10 g Blattmaterial in 20 ml H_2O enthalten waren, der Auszug also 50%ig war.

5. Chromatographie

Die chromatographische Analyse der Blattauszüge erfolgte auf Schleicher und Schüll 2045 a oder b und in folgenden Fließmittelsystemen: Butanol—Eisessig—Wasser (4 : 1 : 5) besonders für phenolische Säuren, abgekürzt als BAW, Chloroform—Eisessig—Wasser (25 : 50 : 20) vor allem für Flavonoide, abgekürzt als CAW.

Die Temperatur betrug durchschnittlich 18° C, die Laufzeit in beiden Gemischen 15 bis 18 Std. Wir chromatographierten aufsteigend eindimensional, nur bei der Bestimmung der Aglykone von Flavonolen fanden auch zweidimensionale Chromatogramme Verwendung, worauf im betreffenden Abschnitt näher eingegangen werden wird.

Die wäßrigen Gesamtauszüge waren nicht bei allen Blattarten direkt zur Chromatographie geeignet, da infolge störender Begleitstoffe keine ausreichende Trennung eintrat. Die von Klein im Handbuch der Pflanzenanalyse referierte Bleimethode (Fällung der org. Säuren als Bleiacetatkomplex und Zersetzung des Niederschlags mit H_2S) erwies sich besonders bei Ahorn- und Kastanienauszügen als sehr brauchbares Mittel, um gute Chromatogramme zu erhalten.

Zur sicheren Erfassung der flavonoiden Substanzen wurden die Auszüge mit Äthylacetat ausgeschüttelt (bei eingeengten 50%igen Extrakten 1 Teil Äthylacetat auf 1 Teil Auszug, bei 10%igen Extrakten 1 Teil Äthylacetat auf 5 Teile Auszug). Um eine möglichst weitgehende Anreicherung von Flavonolen zu erzielen, wurde die Essigesterphase einige

Zeit über der Lösung belassen. Zeigten die aus der organischen Phase angefertigten Chromatogramme keine Zunahme des Flavonolgehalts mehr an, so wurde die Oberphase abgezogen.

Zur Bestimmung der Aglykone wurde die Essigester-Ausschüttelung mit verdünnter HCl versetzt, durch Erhitzen im Wasserbad hydrolysiert und anschließend neutralisiert.

Folgende Farbreagenzien wurden (neben dem Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen) zur Identitätsprüfung herangezogen: $FeCl_3$ 1%ig in Methanol, Azokupplung durch das PAULY-Reagenz (0,5% diazotierte Sulfanilsäure in 50%igem Äthanol), beide Reagenzien dienten vorwiegend zur Bestimmung von phenolischen Verbindungen.

Flavonole wurden auf Grund der Fluoreszenz im UV-Licht und der Änderung dieser Fluoreszenz nach dem Alkalisieren mit NH_3-Gas sowie dem Besprühen mit $AlCl_3$, basischem Bleiacetat (beide 1%ig in Methanol) und 1n NaOH identifiziert.

Die Zucker der Flavonolglykoside wurden durch Besprühen mit Anilin-Phthalsäure nachgewiesen.

Für die Angaben über die relative Konzentration der gefundenen Substanzen gilt folgender Schlüssel:

$+$ = Spuren, $++$ = mäßige Konzentration, $+++$ = hohe Konzentration.

Die Rf-Werte sind wie üblich auf Grund der Entfernung Startpunkt—Substanzmittelpunkt errechnet und stellen Mittelwerte aus zahlreichen Einzelmessungen dar.

6. Atmungsmessungen

Die Messung der Atmungsgrößen erfolgte nach dem modifizierten Verfahren von ISERMEYER, so wie es durch SCHWEGLER, POSCHENRIEDER und BUKATSCH 1959 beschrieben wurde. Zur Bindung des CO_2 wurden die Weckgläser mit jeweils 50 ml n/10 NaOH beschickt. Diese Menge erwies sich als die günstigste, da die besten Titrationsergebnisse dann erzielt wurden, wenn die Hälfte bis zwei Drittel der vorgelegten NaOH nach Ablauf der Versuchszeit zur Rücktitration verblieben. Bei weitgehenderer Neutralisation der NaOH durch das Atmungs-CO_2 wurden die Titrationswerte unscharf, was auf die Pufferwirkung des entstandenen Bikarbonats zurückzuführen war. Nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen erfolgte die Rücktitration mit n/10 HCl unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator. 1 ml umgesetzter Lauge entspricht 2,2 mg CO_2. Die Atmungswerte beziehen sich auf Papierscheiben von durchschnittlich 30 cm^2 Fläche.

Die Versuchsorganismen wurden bei 23—25° C in Rundfilter-Flüssigkeitskulturen mit Petrischalen von 7 cm Durchmesser und 1,5 cm Höhe kultiviert. Das Substrat, Papierscheiben aus Chromatographiepapier S & S 2045 b, wurde in Nährlösung sterilisiert und durch Eintauchen in eine Flüssigkeitskultur in Dichtsaat beimpft. Die Schalen enthielten immer 6 ml Nährlösung.

Der mittlere relative Fehler der Versuchsreihen wurde aus den Quadraten der Abweichungen je dreier Parallelen nach der GAUSS'schen Methode bestimmt.

Versuche und Ergebnisse

1. Gewinnung der Mikroorganismen

Die Reinzüchtung von cellulosezersetzenden Myxobakterien erfordert besondere Verfahrensweisen und ist bisher nur einigen Autoren gelungen (OMELIANSKY, STAPP und BORTELS, SPEYER), da fast immer Rohkulturen besser wachsen als Reinkulturen, und so beispielsweise STAPP und BORTELS zur Auffassung kamen, amikrocystogene Cytophagen könnten nur in Symbiosekulturen erfolgreich weitergezüchtet werden.

Die Herstellung der Anreicherungskulturen erfolgte nach der von IMSENECKI beschriebenen Methode. Auf Filtrierpapier (in Nährlösung sterilisiert), das in einer Petrischale auf 1%igem nährstofffreiem Agar ausgebreitet ist, wurden etwa 5—10 Erdklümpchen gelegt und bei 28° C bebrütet. Da der Agar aber manchmal Stoffe enthält, die die Entwicklung von Sporocytophagen verhindern könnten, wurden in Abwandlung dieser Methode die Erd-

klümpchen ohne Agar direkt auf den Boden einer Petrischale ausgestreut und in etwas Nährlösung aufgeschwemmt. Als Kohlenstoffquelle diente ziehharmonikaartig eingelegtes Filtrierpapier.

Die nach 3 Tagen erscheinenden bräunlichen bis gelben Kolonien wurden in Reagenzgläser mit Papierstreifen eingeimpft. Es zeigte sich, daß die Bildung der Kolonien ohne Agar wesentlich rascher und mannigfaltiger vor sich ging, was wohl auf die bessere Durchfeuchtung des Papiers und auf das leichtere Fortkommen der Bakterien, vor allem der Myxobakterien (Wasser statt Agar) zurückzuführen ist.

Den wichtigsten Schritt innerhalb der weiteren Reinzüchtung stellt die Entfernung der fast immer reichlich vorhandenen Protozoen (Ciliaten, Flagellaten, Amöben) und Pilze dar. Zu diesem Zweck wurden dünne Glaskapillaren gezogen, deren Öffnungen für die genannten Organismen und deren Sporen zu klein waren. Diese Kapillaren tauchte ich kurz in eine Probe der Anreicherungskulturen und kontrollierte anschließend mit dem Mikroskop auf Abwesenheit der auszuschließenden Organismen. „Reine" Kapillaren wurden wieder auf Röhrchen mit Papierstreifen übertragen. Auf diese Weise konnten bei zehn Übertragungen auf Anhieb neun protozoen- und pilzfreie Rohkulturen erhalten werden. Eine weitere Reinzüchtung durch Übertragung infizierter, mehrmals in sterilem H_2O gewaschener Fasern besonders aus der Randzone der Kolonien in neue Röhrchen führte selbst nach langen Versuchen nicht zum Erfolg. Als geeignete Maßnahme erwies sich hingegen die Überimpfung der Rohkulturen auf Celluloseagar, den bereits Stapp und Bortels, Imsenecki sowie Speyer mit Erfolg bei der Reinzüchtung ihrer Kulturen benutzt hatten. In diesem Medium läßt sich nämlich jede Verunreinigung der Kulturen durch eine Trübung der Auflösungsfelder in der Celluloseschicht unschwer erkennen. Reinkulturen hingegen zeigen klare Auflösungsfelder. Durch Überimpfen aus der Randzone solcher Höfe und unter Ausnutzung der Hitzetoleranz der Sporocytophagen (2′ bei 60°!) ist Speyer (1952) die Reinzüchtung einiger Stämme gelungen. Bei der in der vorliegenden Arbeit benutzten Rohkultur versagte jedoch Speyers Methode, da die Begleitflora auch hitzeresistente Formen enthielt.

Die geschilderten Isolierungsmaßnahmen führten zu zwei lebhaft cellulosezersetzendenn Kulturen, die sich schon äußerlich auf Grund des verschiedenen Aussehens der Kolonien leicht unterscheiden ließen. Eine Kultur verwandelte das Papier in eine dottergelbe, schleimige Masse, der andere Stamm hingegen war rot und nicht schleimig.

Die Bestimmung des gelben Stammes nach Bergey ergab, daß es sich um *Sporocytophaga myxococcoides* handelt. Dieses Ergebnis wurde absolut sicher, als nach Erhalt der Reinkultur ATCC 10010 ein Vergleich beider Stämme möglich war.

Die rote Kultur erwies sich als ein typisches Myxobakterium mit Fruchtkörperbildung und einer deutlichen Tendenz zur Schwarmbildung. Nach Bergey konnte der Stamm als *Polyangium cellulosum* bestimmt werden[1]). Die Kultur fand aber im Rahmen dieser Arbeit keine Verwendung und soll nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

2. Vorversuche über die Wirkung der Laubextrakte auf das Wachstum von *Sporocytophaga myxococcoides*

Reagenzgläsern, die einen Streifen Filtrierpapier sowie 4 ml Nährlösung enthielten, wurde nach dem Sterilisieren je 1 ml 5%iger Extrakt zugefügt, was einer Testkonzentration von 1% entsprach.

Als Versuchsorganismen dienten der Sporocytophagenstamm B 490 aus dem Institut Pasteur Paris und die eigene Rohkultur desselben Zersetzers. Die Versuchsdauer betrug 7 Tage, die Temperatur 28°.

Der Versuch zeigt deutlich eine stark ausgeprägte Hemmung durch *Acer* und *Aesculus*$_1$, sowie eine weniger gut ausgeprägte Hemmung durch *Carpinus*. Die Versuchsergebnisse laufen bei beiden Stämmen annähernd parallel.

[1]) Für die Mithilfe bei der Bestimmung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Kühlwein.

Wachstum von Stamm B 490 aus Paris bei Zusatz von Herbstlaubauszügen

Kontrolle	*Fagus*	*Carpinus*	*Quercus*	*Aesculus*$_1$	*Tilia*	*Acer*	*Betula*
+++	+++	+++	+++	—	+++	++	+++
+++	+++	++	+++	—	+++	+	+++
+++	+++	++	+++	+	++	+	+++

Wachstum des eigenen Stammes bei Zusatz von Herbstlaubauszügen

Kontrolle	*Fagus*	*Carpinus*	*Quercus*	*Aesculus*$_1$	*Tilia*	*Acer*	*Betula*
+++	+++	++	+++	—	+++	—	+++
+++	+++	++	+++	+	+++	+	+++
+++	+++	++	+++	+	+++	+	+++

Die visuelle Beurteilung des Wachstums geschah nach folgendem Schema, wobei jeweils drei Parallelansätze zugrunde lagen:

— = kein Wachstum ++ = mäßig gutes Wachstum
+ = schwaches Wachstum +++ = sehr gutes Wachstum

Ein gutes Kriterium für die Wachstumsverhältnisse war auch die Tatsache, daß bei *Fagus*, *Quercus*, *Tilia*, *Betula* und der Kontrolle der Papierstreifen in Höhe des Flüssigkeitsspiegels glatt durchgetrennt war, bei *Carpinus* gelang die Durchtrennung nur nach kräftigem Schütteln und unvollkommen, bei *Acer* und *Aesculus*$_1$ war eine Trennung des Streifens auch durch Schütteln nicht mehr zu erreichen, da das Papier in keiner Weise angegriffen war.

3. Quantitative Bestimmung der Wirkung der Blattauszüge durch vergleichende Atmungsmessungen an einer Reinkultur (ATCC 10010)

Da ein erster Test mit 1%iger Extraktkonzentration so gut wie keine Atmungsunterschiede bei den einzelnen Blattauszügen ergab — die Wachstumsbedingungen waren ja in den Rundfilter-Flüssigkeitskulturen viel besser als in den Reagenzgläsern des Vorversuchs und der Stamm ATCC 10010 aktiver als B 490 und der eigene Stamm —, wurden die Auszüge in 2- und 4%iger Konzentration getestet. Der Ansatz des Versuchs erfolgte entsprechend den Angaben im methodischen Teil.

Tab. 1 gibt die innerhalb von 7 Tagen entwickelten CO_2-Mengen wieder. Sie läßt erkennen, daß die Atmungsgrößen im wesentlichen mit den Ergebnissen der Vorversuche übereinstimmen, die ebenfalls eine Hemmung durch *Aesculus*$_1$ und *Acer* zeigten.

Interessant ist die Tatsache, daß die im Vergleich zum Ahornauszug stärkere Hemmung des *Aesculus*$_1$-Extraktes eine Parallele in den entsprechenden Vorversuchen besitzt. Er bewirkt nämlich bereits in 1%iger Konzentration eine Hemmung, die der Acerauszug erst in 4%iger Konzentration erzielt. In den gehemmten Kulturen war mit bloßem Auge keine Kolonie festzustellen.

Eindeutige Förderungen, die größenordnungsmäßig mit den Hemmungen zu vergleichen wären, zeigen die Atmungswerte nicht. Die Abweichungen erfolgen zwar in der Regel positiv zur Kontrolle, doch liegen diese Werte mit Ausnahme der Eiche knapp außerhalb oder noch innerhalb des Fehlers, so daß allenfalls der Auszug aus *Quercus robur* etwas fördernd auf das Wachstum wirken könnte.

Tabelle 1

Atmungsgrößen von Stamm ATCC 10010

	Fagus		*Acer*		*Aesculus*$_1$	
Konzentration der Auszüge in %	2	4	2	4	1	2
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	44,0	51,8	46,8	8,8	8,8	12,3
mittlerer rel. Fehler in % ±	4,6	1,5	5,0	2,4	3,8	2,0
Atmungsgröße der Kontrolle in mg CO_2	47,5		48,0		48,0	
mittlerer rel. Fehler in % ±	3,2		3,2		3,0	

Auffallend ist ferner, daß nur ein Auszug von *Aesculus*-Blättern hemmt, der andere hingegen keinerlei Wirkung zeigt. Es handelte sich hier um Blätter verschiedener Herkunft, die zudem bei *Aesculus*$_2$ als Fallaub vom Boden aufgelesen worden waren, während das Herbstlaub von *Aesculus*$_1$ vom Baum selbst geerntet worden war. Dieser Unterschied wird bei den Ergebnissen der chromatographischen Untersuchungen noch von Wichtigkeit sein.

4. Wirkung der Extrakte nach Entfernung der Gerbstoffe und phenolischen Verbindungen durch Ausschütteln mit Hautpulver

Auf Grund der Arbeiten von BENDZ, der Gallussäure aus Laubstreu von *Acer platanoides* isolierte, und der Untersuchungen von KNÖSEL über den Einfluß von p-Hydroxybenzoesäure auf die Mikroflora des Bodens sowie der Ergebnisse von SÄURIG und BUKATSCH, die den Einfluß von Herbstlaubauszügen auf *Azotobacter chroococcum* studierten, lag es nahe, Gerbstoffe oder einfache phenolische Säuren als hemmende Agentien zu vermuten.

Der Gehalt an Gerbstoffen wurde daher durch dreimaliges Schütteln der Auszüge mit Merckschem Hautpulver p. a. entfernt. Die Extrakte wurden durch zweimaliges Zentrifugieren dem Hautpulver wieder entzogen und anschließend noch eimal mit frischem Hautpulver geschüttelt. Die Messung der Atmungsgrößen erfolgte in denselben Konzentrationen, in denen sie gerbstoffhaltig hemmten.

Die Bestimmung der Atmungsgrößen nach der modifizierten ISERMEYER'schen Methode ergab folgendes Bild:

Tabelle 2

Atmungsgrößen von Stamm ATCC 10010 bei Zusatz gerbstofffreier Blattauszüge

	Acer		*Aesculus*$_1$	
Konzentration der Auszüge in %	2	4	1	2
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	49,5	53,9	47,5	50,0
mittlerer rel. Fehler in % ±	5,0	4,8	3,6	2,4
Atmungsgröße der Kontrolle in mg CO_2	50,0		50,0	
mittlerer rel. Fehler in % ±	3.2		3,2	

bei Zusatz von Herbstlaubauszügen

Aesculus$_2$		*Tilia*		*Quercus*		*Betula*		*Carpinus*	
2	4	2	4	2	4	2	4	2	4
50,0	44,5	45,8	52,4	52,9	54,0	51,2	49,3	51,6	50,6
1,0	1,1	3,8	1,5	2,0	1,6	4,3	2,0	3,4	1,0
47,5		47,5		45,2		46,0		47,5	
3,2		3,2		3,2		3,2		3,2	

Der Versuch zeigt eindeutig, daß die hemmende Wirkung von *Acer* und *Aesculus*$_1$ in gerbstofffreien Auszügen völlig verschwunden ist. Die Kontrollatmung und die Atmungsgröße bei Zugabe der gerbstofffreien Extrakte stimmen innerhalb der Fehlergrenze überein.

5. Chromatographische Analyse der Blattauszüge

Es lag nun nahe, durch geeignete chromatographische Methoden die genannten Auszüge auf das Vorkommen von Gerbstoffen und verwandten Verbindungen hin zu untersuchen, zumal auf Grund der Befunde der bereits genannten Autoren sich vermuten ließ, daß *Sporocytophaga* durch phenolische Blattinhaltsstoffe gehemmt werde.

Zahlreiche Fließmittelsysteme sind zur Trennung phenolischer Substanzen beschrieben worden. Meist wurde mit dem BAW Gemisch (Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5, organische Phase) gearbeitet, welches sich auch bei den vorliegenden Untersuchungen als gut geeignet erwies.

5.1 Untersuchung der hemmenden Extrakte

5.11 a *Acer platanoides* — phenolische Verbindungen

Um eine erste Übersicht über die Inhaltsstoffe der Blätter von *Acer* zu gewinnen, wurde der wäßrige Gesamtauszug (10 oder 50%ig) aufsteigend in BAW chromatographiert. Zur sicheren Erfassung der phenolischen Inhaltsstoffe empfahl sich die Anwendung der Bleimethode. Durch Vergleichschromatographie und auf Grund der Farbreaktionen mit $FeCl_3$ und DSS (diazotierte Sulfanilsäure) konnten p-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Phloroglucin und Gallussäure festgestellt werden.

Tab. 3 gibt Rf-Werte, relative Menge und Reaktionen der gefundenen Verbindungen mit den erwähnten Nachweisreagenzien wieder.

Der Phloroglucingehalt der Ahornauszüge war so hoch, daß die Wiesnersche Lignin-färbung eindeutig ausführbar war. Es genügte zu diesem Zweck, einen Holzspan, bis er völlig durchtränkt war, in den Extrakt zu legen und ihn anschließend in konz. HCl zu überführen. Der Holzspan nahm eine kirschrote Färbung an, die von einem Vergleichsspan, der in Phloroglucin-Salzsäure gefärbt worden war, nicht zu unterscheiden ist.

Auffallend war, daß die Chromatogramme frisch hergestellter und sofort eingeengter Extrakte nur Gallussäure und etwas Phloroglucin, nur in Spuren aber, oder überhaupt keine Protocatechusäure und p-Hydroxybenzoesäure zeigten. Wurde derselbe Auszug, der zu-

Tabelle 3
Phenolische Verbindungen von *Acer*

	rel. Konzentration	Rf	Reaktion mit $FeCl_3$	Reaktion mit DSS + NH_3 Gas
p-Hydroxybenzoesäure	++	0,93	gelb	gelb
Protocatechusäure	++	0,83	gelbgrün	braunviolett
Phloroglucin	+++	0,71	schwach braun	leuchtend rot
Gallussäure	+++	0,60	blauschwarz	braun

nächst in der eben erwähnten Weise reagierte, im Kühlschrank längere Zeit aufbewahrt, so konnten im Laufe von 14—21 Tagen auch die beiden zunächst fehlenden Substanzen nachgewiesen werden. Auch zeigten Acetonlösungen aus Gelatinefällungen des Ahornextraktes dasselbe Verhalten wie frisch gewonnene und allmählich alternde wäßrige Auszüge, nämlich zuerst nur Gallussäure und Spuren von Phloroglucin, später auch die beiden anderen Säuren. Berücksichtigt man, daß keine der vier Verbindungen mit Gelatinelösung eine Fällung ergibt, so liegt der Schluß nahe, daß ein höhermolekularer Körper, der mit Gelatinelösung reagiert, also typischen Gerbstoffcharakter besitzt, mit der Zeit in Oligo- bis Monomere zerfällt, wie sie die Chromatogramme nach und nach erkennen lassen.

Ein Unterschied hinsichtlich der Wirkung frischer und älterer Extrakte konnte nicht festgestellt werden.

5.11 b *Acer platanoides* — flavonoide Verbindungen und Cumarinderivate

Außer den bisher behandelten phenolischen Säuren ließen die Chromatogramme im UV auch fluoreszierende Verbindungen erkennen. Die Flecken zeigten besonders nach dem Besprühen mit $AlCl_3$ eine starke Intensivierung der Fluoreszenz, so daß der Schluß nahe lag, er könnte sich um flavonoide Verbindungen handeln. Zur sicheren Identifizierung dieser Stoffklasse erwiesen sich Chromatogramme aus der Essigesterphase als sehr gut geeignet. Doch war die Trennung der Flavonole im BAW-Gemisch nicht ausreichend.

Diese Schwierigkeit konnte mit dem von Egger für Flavonole erarbeiteten ternären System Chloroform-Eisessig-Wasser (CAW) überwunden werden. Die Trennung verlief in diesem Gemisch praktisch ohne Schweifbildung, eine große Erleichterung bei der Bestimmung der Flavonole. Die Flecke wanderten scharf, so daß auch geringe Unterschiede im Rf-Wert eine sichere Erfassung noch zuließen.

Eine erste Übersicht über die vorhandenen Flavonole bietet Tab. 4 mit dem Ergebnis der Hydrolyse der Essigesterphase. Von den angeführten Nachweisreaktionen ist die Änderung der Fluoreszenz nach dem Besprühen mit basischem Bleiacetat besonders wichtig, da sie (nach Linskens) eine klare Unterscheidung von Kämpferol und Quercetin sowie deren Glykoside ermöglicht.

Weitere in Tab. 4 nicht aufgeführte fluoreszierende Verbindungen waren nicht vorhanden. Die Reaktion auf Flavonone mit KOH verlief ohne Ergebnis.

Die Zucker konnten im gleichen Lauf mit Anilin-Phthalsäure nachgewiesen werden. Es fanden sich Glukose sowie geringe Mengen von Aarabinose und Rhamnose. Sie liefen im CAW-Gemisch wesentlich höher als in den sonst üblichen Systemen und hatten folgende Rf-Werte: Glukose 0,52, Arabinose 0,59, Rhamnose 0,64.

Nachdem die Hydrolyse nur 2 Flavonolaglykone sowie ein Cumarinderivat, das Aesculetin, aufgezeigt hatte, wurde versucht, den Glykosiden die gefundenen

Aglykone zuzuordnen. Nach EGGER bestehen im CAW-Gemisch klare Beziehungen zwischen der Steighöhe von Flavonolglykosiden und dem zugrunde liegenden Aglykon.

Es gilt allgemein:

Rf(My-hex) < Rf(My-rh) < Rf(Qu-hex) < Rf(Qu-rh) < Rf(K-hex) < Rf(K-rh)

Es bedeuten: My = Myricetin, Qu = Quercetin, K = Kämpferol, hex = Hexosid, rh = Rhamnosid.

Tabelle 4

Aglykone von *Acer* nach erfolgter Hydrolyse

	rel. Konz.	Rf_1	Rf_2	Reaktion mit: $AlCl_3$ TL	$AlCl_3$ UV	bas. Pb TL	bas. Pb UV	NH_3 Gas TL	NH_3 Gas UV
Quercetin	+++	0,42	0,68	g	g	orbr	or	g g	g
Kämpferol	+++	0,68	0,85	ggr	g	g	ggr	g	ggr
Aesculetin	++	0,75	0,74	—	hbl	—	hbl	—	wbl

TL = Tageslicht, UV = Ultraviolett, bl = blau, g = gelb, gr = grün, w = weiß, br = braun, or = orange, h = hell, bas. Pb = basisches Bleiacetat, Rf_1 in CAW, Rf_2 in BAW

Besprühen der Chromatogramme mit basischem Bleiacetat zeigte, daß jene Beziehung zwischen Steighöhe und Flavonoltypus auch in diesem Falle eindeutig an der verschiedenen Fluoreszenz der oberen und mittleren Rf-Bereiche zu erkennen war. 2 Flecken mit Rf 0,68 und 0,80 nahmen eine intensiv grüngelbe Fluoreszenz an. Hier war wohl Kämpferol zu vermuten. Darunter von Rf 0,40 bis 0,60 traten orangefarbene Töne auf, die sich auf 3 Flecken mit Rf 0,42, 0,53 sowie 0,60 konzentrierten und so Quercetinglykoside vermuten ließen.

Durch Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen und auf Grund weiterer Farbreaktionen konnten folgende Flavonole und Cumarinderivate ermittelt werden[1]).

Tabelle 5

Flavonole und Cumarinderivate der Essigesterphase von *Acer*

	rel. Konz.	Rf_1	Rf_2	Reaktion mit: $AlCl_3$ TL	$AlCl_3$ UV	bas. Pb TL	bas. Pb UV	In NaOH TL	In NaOH UV	NH_3 Gas TL	NH_3 Gas UV
Quercetin	++	0,42	0,68	g	g	orbr	or	g	g	g	g
Rutin	++	0,53	0,37	g	br	g	g	orbr	or	g	gbr
Kämpferol	++	0,68	0,85	ggr	g	g	ggr	g	ggr	g	g
Aesculetin	++	0,75	0,74	—	hbl	—	hbl	—	hbl	—	wbl

TL = Tageslicht, UV = Ultraviolett, bas. Pb = basisches Bleiacetat, g = gelb, gr = grün, br = braun, or = orange, bl = blau, h = hell, w = weiß, Rf_1 in CAW, Rf_2 in BAW

[1]) Herrn Prof. Dr. L. HÖRHAMMER verdanken wir die Überlassung einer Probe Kämpferol zu Vergleichszwecken.

Glykoside wie Aglykone stimmten im Rf-Wert genau mit der Vergleichssubstanz überein.

Tab. 5 enthält jedoch nicht alle bei *Acer* gefundenen Flavonole. Es waren noch 2 Flecken vorhanden, denen entsprechend den in Tab. 6 aufgeführten Reaktionen Kämpferol bzw. Quercetin als Aglykon zukommen mußte.

Tabelle 6

Unbekannte Flavonole der Essigesterphase von *Acer*

Rf_t	rel. Konz.	Reaktion mit:									
				$AlCl_3$		bas. Pb		ln NaOH		NH_3 Gas	
		TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV
0,80	+++	g	g	g	ggr	g	ggr	g	g	g	ggr
0,60	++	g	g	g	g	gbr	or	g	g	g	g

TL = Tageslicht, UV = Ultraviolett, bas. Pb = basisches Bleiacetat, g = gelb, gr = grün, br = braun, or = orange, Rf_t in CAW.

Einen weiteren Beweis für die richtige Zuordnung der beiden Aglykone lieferten zweidimensionale Chromatogramme, indem vor dem zweiten Lauf (ebenfalls in CAW) durch Besprühen des Bogens mit verd. HCl und sofortigem Abdampfen der Säure mit Heißluft hydrolysiert wurde. Es liefen dann nur mehr die zwei Flavonolaglykone in die zweite Laufrichtung sowie das Aesculetin, wobei Kämpferol über den Bereichen 0,80 und 0,68, Quercetin über den Bereichen 0,60, 0,53 und 0,42 erschien. Die Hydrolyse verlief vollkommen, so daß nach dem zweiten Lauf keine Glykoside mehr auftraten.

Eine genauere Erfassung des unbekannten Quercetin- bzw. Kämpferolderivats konnte nicht erfolgen, da keine Vergleichssubstanz vorhanden war. Die gelbe Fluoreszenz beider Substanzen in unbehandeltem Zustand (Glykoside sollten nach Harborne braun fluoreszieren) sowie der hohe Rf-Wert würden nach Egger für Methyläther des Kämpferols bzw. des Quercetins sprechen.

5.12a *Aesculus hippocastanum*$_1$ — phenolische Verbindungen

Die Prüfung des Gesamtauszuges auf phenolische Oxysäuren ergab keine Anhaltspunkte für ihr Vorkommen, da der hochviskose Extrakt völlig ungeeignet für die Chromatographie war. Erst nach Anwendung der Bleimethode gelang der Nachweis von Gallussäure in mäßiger Konzentration, als einziger phenolischer Verbindung. Ihre Menge war deutlich geringer als bei *Acer*.

5.12b *Aesculus*$_1$ — flavonoide Verbindungen

Die Hydrolyse der Äthylacetatausschüttelung ergab folgende Aglykone.

Tabelle 7

Flavonole im Hydrolysat von *Aesculus*$_1$

	rel. Konz.	Rf_t
Quercetin	+++	0,42
Kämpferol	++	0,68

Rf_t in CAW

Eine Darstellung der Farbreaktionen erübrigt sich, da sie bereits bei *Acer* gegeben sind und diesen entsprechen. Die Konzentration des Quercetins lag bei *Aesculus*$_1$ noch etwas höher als bei *Acer*.

Der Zuckernachweis mit Anilin-Phthalsäure ergab Glukose, Arabinose und Rhamnose.

Die nichthydrolysierte Essigesterphase zeigte im Chromatogramm mit CAW ebenfalls nur 2 Flecke. Tab. 8 bringt die Rf-Werte und die entsprechenden Reaktionen.

Tabelle 8

Flavonole der Essigesterphase von *Aesculus*$_1$

	Reaktion mit:											
			$AlCl_3$		bas. Pb		In NaOH		NH_3 Gas	
Rf_1	TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV
0,80	g	br	g	ggr	g	g	g	g	g	g
0,70	g	br	g	g	gbr	or	g	g	g	g

TL = Tageslicht, UV = Ultraviolett, g = gelb, gr = grün, br = braun, or = orange, bas. Pb = basisches Bleiacetat, Rf_1 in CAW.

Die Angaben über die relative Konzentration sind mit Tab. 7 identisch und daher weggelassen.

Die Substanz mit Rf 0,70 konnte durch Vergleichschromatographie als Quercitrin bestimmt werden. Zweidimensionalgelaufene Bögen zeigten Kämpferol nur über dem Fleck mit Rf 0,80 (vor dem 2. Lauf wurde wie bei *Acer* durch Besprühen mit verd. HCl hydrolysiert), über dem Bereich mit Rf 0,70 lag wie zu erwarten Quercetin. *Aesculus*$_1$ enthielt also außer Quercitrin in seinen Herbstblättern auch noch ein Kämpferolglykosid, wohl das Arabinosid. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Hörhammer, Gehrmann und Endres an grünen Blättern von *Aesculus hippocastanum* überein. Die genannten Autoren stellten sehr hohe Konzentrationen an Quercitrin, schwächere Konzentrationen an Kämpferol-3-arabinosid und Spuren von Isoquercitrin fest.

Die letztgenannte Substanz war vermutlich auch bei *Aesculus*$_1$ in Spuren vorhanden, wofür der positive Glukosenachweis sprechen würde. Isoquercitrin konnte jedoch in den Chromatogrammen, wohl infolge des sehr starken Auftretens von Quercitrin und des geringen Unterschiedes im Rf-Wert, nicht gefunden werden.

5.2 Untersuchung der nicht wirksamen Auszüge

5.2a Phenolische Inhaltsstoffe wurden aus dem Gesamtauszug (10%ig) nachgewiesen. Dies war ohne weiteres möglich, da die Auszüge nicht annähernd so viskos wie bei *Aesculus*$_1$ waren.

Tab. 9 enthält die phenolischen Verbindungen in ihrer Verteilung auf die bisher noch nicht behandelten Herbstblätter von *Quercus robur*, *Tilia ulmifolia*, *Fagus silvatica*, *Betula pendula*, *Carpinus betulus* und *Aesculus hippocastanum*$_2$.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen aus der Analyse der hemmenden Auszüge ergibt, daß die vier phenolischen Verbindungen regelmäßig, wenn auch nicht immer

Tabelle 9

Phenolische Verbindungen der nicht hemmenden Auszüge

	Quercus	*Tilia*	*Fagus*	*Betula*	*Aesculus*$_2$	*Carpinus*
p-Hydroxybenzoesäure	+	+	—	+	—	—
Protocatechusäure . .	+	+	—	+	++	+
Phloroglucin	+	+	—	+	++	—
Gallussäure	+	—	—	—	—	++

vollzählig, vorhanden sind, mit Ausnahme von *Fagus*. Fast durchweg aber liegt die Menge der Substanzen in den genannten Extrakten nahe der Nachweisgrenze. Nur bei *Aesculus*$_2$ und *Carpinus* werden in einzelnen Fällen mäßige Konzentrationen erreicht. Weitere phenolische Körper konnten nicht festgestellt werden.

5.2 b Flavonole wurden in der Äthylacetatphase bei keiner Laubsorte gefunden.

Lediglich Aesculetin und sein Glukosid Aesculin waren in folgender Verteilung vorhanden (Tab. 10).

Tabelle 10

Inhaltsstoffe der Essigesterphase der nicht hemmenden Auszüge

	Quercus	*Tilia*	*Fagus*	*Betula*	*Aesculus*$_2$	*Carpinus*
Aesculetin	+	++	+	+	—	+
Aesculin	—	—	—	—	—	+

Es besteht die Möglichkeit, daß auch Fraxetin und Scopoletin in Spuren vorhanden waren, eine genaue Angabe über ihr Vorkommen konnte aber mangels Vergleichssubstanz nicht gemacht werden.

Vergleicht man die für *Aesculus*$_1$ und $_2$ gefundenen Inhaltsstoffe, so fällt auf, daß *Aesculus*$_2$ die für Kastanie typischen Flavonole nicht enthält. Die Erklärung dieses Sachverhalts als standortsbedingt scheidet aus, da Blätter vom Standort *Aesculus*$_2$, kurz vor dem Laubfall vom Baum weg geerntet, einen hohen Gehalt von Quercitrin, Aesculin und Kämpferol-3arabinosid zeigten, der in seiner Höhe mit den für *Aesculus*$_1$ gefundenen Konzentrationen vergleichbar war. Offenbar ist hier die bereits eingangs erwähnte Tatsache von Bedeutung, daß das Laub des hemmenden Kastanienauszuges direkt vom Baum geerntet worden war, die Blätter des nicht hemmenden Auszuges jedoch aus der frisch gefallenen Laubstreu stammten.

In diesem Zusammenhang seien die Untersuchungen von Winter und Bublitz über die Senkung der Keimprozente von Kresse, Kiefer und Fichte durch Buchenlaub erwähnt, da die genannten Autoren nur durch Laub, das sich noch an Zweigen befand, eine starke Keimungshemmung beobachten konnten. Laubstreu jedoch, welche vom Boden aufgelesen worden war, übte keinerlei Einfluß aus. Dieses Ergebnis läßt sich nur verstehen, wenn man im abgefallenen Blatt einen wesentlich geringeren Wirkstoffgehalt annimmt.

Es scheint also, als ob unmittelbar vor dem Laubfall ein weitgehender Rücktransport von Stoffen in den Stamm vor sich geht. Diese Erscheinung soll weiter untersucht werden.

Eine andere Möglichkeit zur Erklärung der Unterschiede im Wirkstoffgehalt von *Aesculus*$_1$ und $_2$ liegt im Analysenergebnis des *Aesculus*$_2$-Extraktes. Dieser enthält nämlich Phloroglucin und Protocatechusäure, beide in mäßiger Konzentration. Die beiden Verbindungen entstehen beim Abbau von Quercitrin als zugehörige Grundkörper. Das Fehlen von Flavonolen im Auszug von *Aesculus*$_2$ könnte somit auch in einem Abbau dieser Stoffklasse seine Ursache haben.

6. Einfluß der in *Acer* und *Aesculus* gefundenen phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Sporocytophaga myxococcoides*

Nach der Erkenntnis, daß die stark hemmende Wirkung der Extrakte von *Acer* und *Aesculus*$_1$ mit einer hohen Konzentration von zyklischen Pflanzensäuren und Flavonolen in den betreffenden Auszügen gepaart war, lag es nahe, den Einfluß dieser Stoffe durch Zugabe entsprechender Reinsubstanzen zu den Kulturen näher zu untersuchen.

Die im folgenden angeführten Atmungswerte stellen jeweils eine kennzeichnende Versuchsreihe aus einigen (meist 4—5) Testreihen mit drei Parallelen dar. Ein zweimaliger Test kann keine sichere Aussage über die Wirkungsgrenze der untersuchten Substanzen geben, da die Schwelle, von welcher ab kein Wachstum mehr zu beobachten war, manchmal sich in größere oder auch geringere Konzentrationsbereiche verschob. Die Atmungswerte beziehen sich daher auf Versuchsreihen mit einer für die betreffende Substanz typischen Lage des Schwellenwertes. Abweichungen vom normalen Verlauf werden bei den einzelnen Testsubstanzen gesondert behandelt werden.

Die Substanzen wurden auf einer Analysenwaage abgewogen und den Petrischalen vor dem Sterilisieren zugesetzt.

Gehemmte Atmungswerte sind jeweils durch stärkere Umrandung hervorgehoben.

6a Versuchsorganismus ATCC 10010

Tabelle 11

Stamm: ATCC 10010, Testsubstanz: p-Hydroxybenzoesäure

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	38,3	32,3	30,0	3,5	6,2	2,9
mittlerer rel. Fehler in % ±	5,7	1,3	6,2	12,0	9,0	17,0
Kontrollatmung in mg CO_2	$34{,}6 \pm 1{,}3\,\%$					

Nur einmal lag das Wachstum auch bei 0,1% noch in Höhe der Kontrolle. Ein weiteres Mal gelang es in einer einzelnen Parallele bei 0,1% die Kontrollatmung zu erreichen.

Bei 0,1% war das Wachstum mit der Bildung eines blauen Farbstoffes verbunden.

Tabelle 12
Stamm: ATCC 10010, Testsubstanz: Protocatechusäure

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	39,8	37,2	34,0	39,4	3,8	3,5
mittlerer rel. Fehler in % ±	5,0	2,4	5,8	1,4	5,3	5,0
Kontrollatmung in mg CO_2	34,6 ± 1,3 %					

Die Hemmung erfolgte durchweg ab 0,2%. In 2 Versuchsreihen gelang es immer nur einer Parallele, bei 0,1% anzuwachsen.

Tabelle 13
Stamm: ATCC 10010, Testsubstanz: Phloroglucin

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	44,9	43,8	41,1	5,5	3,1	6,0
mittlerer rel. Fehler in % ±	7,0	5,0	5,3	3,1	1,3	6,0
Kontrollatmung in mg CO_2	41,1 ± 1,5 %					

Vereinzelt sank die Wachstumsgrenze bis auf 0,03% ab.

Tabelle 14
Stamm: ATCC 10010, Testsubstanz: Gallussäure

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	40,8	41,8	37,0	41,6	10,4	8,8
mittlerer rel. Fehler in % ±	2,0	1,0	5,0	5,0	10,0	2,2
Kontrollatmung in mg CO_2	45,0 ± 2,2 %					

Die Hemmung begann im Durchschnitt bei 0,2% Gallussäure. Sie verschob sich jedoch manchmal bis 0,05%, während andererseits auch noch bei 0,2% ein Wachstum in allen 3 Parallelen beobachtet werden konnte, das in Höhe der Kontrolle lag. Dieser letzte Fall trat jedoch nur einmal auf.

Die teilweise höheren Fehlerprozente bei gehemmten Werten erklären sich aus der Tatsache, daß die Unterschiede der Titrationswerte in drei Parallelen unabhängig von der Höhe dieser Werte waren. Bei der Umrechnung des mittleren relativen Fehlers in Fehlerprozente ergibt sich daher bei gehemmten Werten, d. h. kleineren Atmungsgrößen, eine geringere Bezugsgröße, wodurch die Fehlerprozente ansteigen.

In allen Schalen mit einer höheren Konzentration an Testsubstanzen traten eine tiefbraune Verfärbung des Mediums und dunkle Niederschläge auf.

6b Versuchsorganismus: eigener Stamm

Der selbst isolierte Stamm zeigte keine solchen Schwankungen der Wachstumsgrenze wie ATCC 10010. Im einzelnen ergaben sich bei den 4 Testsubstanzen folgende Atmungsgrößen:

Tabelle 15

Selbst isolierter Stamm, Testsubstanz: p-Hydroxybenzoesäure

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	38,4	34,4	33,8	5,9	9,0	7,0
mittlerer rel. Fehler in % ±	5,0	5,0	4,0	15,0	10,0	4,0
Kontrollatmung in mg CO_2	$38{,}9 \pm 3{,}5\,\%$					

Die Hemmung begann konstant ab 0,1 %.

Tabelle 16

Selbst isolierter Stamm, Testsubstanz: Protocatechusäure

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	37,6	35,4	35,4	5,0	8,6	9,0
mittlerer rel. Fehler in % ±	1,3	5,5	2,8	10,0	11,0	8,0
Kontrollatmung in mg CO_2	$40{,}7 \pm 2{,}0\,\%$					

Die Bildung eines blauen Farbstoffes, wie ihn der Stamm ATCC 10010 bei 0,1 % Protocatechusäure regelmäßig hervorbrachte, konnte hier nicht beobachtet werden. Vielleicht wäre die Farbstoffbildung erst bei 0,1 % möglich, eine Konzentration, bei der der eigene Stamm kein Wachstum mehr zeigte.

Die Untersuchungen über die Wirkung phenolischer Verbindungen auf das Wachstum von *Sporocytophaga* lassen eine deutliche Hemmung durch alle 4 Substanzen erkennen. Auffallend ist, daß die Hemmung mit steigender Konzentration nicht allmählich zunimmt, sondern schlagartig einsetzt.

Tabelle 17
Selbst isolierter Stamm, Testsubstanz: Phloroglucin

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	36,5	31,5	2,7	3,5	3,1	5,2
mittlerer rel. Fehler in % ±	5,0	3,8	30,0	10,0	13,0	5,0
Kontrollatmung in mg CO_2	40,6 ± 2,2 %					

Die Hemmung erfolgte in einem Fall bereits ab 0,03%! Die Regel war jedoch ein Wachstum bis einschließlich 0,03%.

Tabelle 18
Selbst isolierter Stamm, Testsubstanz: Gallussäure

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	37,8	34,1	34,8	31,8	7,7	8,1
mittlerer rel. Fehler in % ±	0,5	2,0	3,8	2,0	5,0	5,0
Kontrollatmung in mg CO_2	40,6 ± 2,2 %					

Als besonders stark hemmend erweist sich das Phloroglucin, welches das Wachstum des selbst isolierten Stammes bereits in 0,05%iger Konzentration verhindert. An zweiter Stelle folgt p-Hydroxybenzoesäure mit einer Hemmung ab 0,1% bei beiden Stämmen. Protocatechusäure wirkt auf den eigenen Stamm ab 0,1%, auf ATCC 10010 erst ab 0,2% schädlich. Gallussäure endlich hemmt beide Stämme ab 0,2%.

Man könnte einwenden, daß die Hemmung nicht nur substanz-, sondern auch pH-bedingt ist, da die Stoffe ungepuffert verabreicht wurden. Das Nährmedium war jedoch schon auf Grund seiner Zusammensetzung ausreichend gepuffert. Zudem zeigt gerade Phloroglucin, welches von allen Verbindungen die geringste Acidität aufweist, die stärkste Wirkung.

Im Falle der p-Hydroxybenzoesäure wäre an eine evtl. Verdrängung von p-Aminobenzoesäure als schädigenden Effekt zu denken. Es wurde daher versucht, durch Zugabe von 0,01, 0,05 und 0,1% p-Aminobenzoesäure zu entsprechend bakteriostatisch wirkenden Konzentrationen an p-Hydroxybenzoesäure eine Verringerung oder Beseitigung der Hemmung zu erreichen. Es gelang aber durch derartige Zusätze nicht, den Schwellenwert von p-Hydroxybenzoesäure in höhere Konzentrationsbereiche zu verschieben. An eine Konkurrenzhemmung der p-Hydroxybenzoesäure ist also wohl kaum zu denken.

6c Wachstum von *Sporocytophaga* auf Chromatogrammen von Blattextrakten

Es lag nahe, die hemmende Wirkung der phenolischen Verbindungen direkt am Chromatogramm eines Blattauszuges zu zeigen. Zu diesem Zweck wurde ein Streifen mit einer Flüssigkeitskultur besprüht und anschließend bebrütet. Es gelang aber nicht, den Hemmeffekt auf den Lagebereich der einzelnen Verbindungen zu lokalisieren, da die Stoffe in der notwendigerweise sehr feuchten Brutatmosphäre in den gesamten Bereich des Chromatogrammstreifens diffundierten. Es konnte daher, je nachdem die aufgetragene Extraktmenge im ober- oder unterschwelligen Bereich lag, ein gleichmäßiges Wachstum über den gesamten Streifen oder ein Ausbleiben der Kolonien festgestellt werden, wobei im Falle einer Hemmung nirgends ein Anwachsen beobachtet werden konnte. Es war möglich, vor dem Bebrüten der Chromatogramme die Eisenchloridreaktion durchzuführen, ohne daß dadurch ein Anwachsen der Bakterien in Frage gestellt wurde.

7. Einfluß der in *Acer*- und *Aesculus*-Extrakten gefundenen flavonoiden- und cumarinartigen Verbindungen auf das Wachstum von *Sporocytophaga*

Von den chromatographisch gefundenen Flavonolen konnten nur Rutin und Quercitrin sowie das Cumarinderivat Aesculin getestet werden. Die übrigen Flavonole standen nur in äußerst geringen Mengen oder überhaupt nicht zur Verfügung.

7a Versuchsorganismus ATCC 10010

Tabelle 19

Stamm: ATCC 10010, Testsubstanz: Quercitrin

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	44,9	43,8	41,1	43,8	42,2	11,4
mittlerer rel. Fehler in % ±	7,0	5,0	5,3	1,6	0,5	8,0
Kontrollatmung in mg CO_2	$47{,}7 \pm 0{,}5\%$					

Das Nährmedium war bei 0,2% mit Quercitrin gesättigt, so daß sich bei 0,3% ein Bodensatz bildete. Nur in einer Versuchsreihe wuchsen die Bakterien bei 0,2% in 2 Parallelen nicht mehr an. Die Wachstumsgrenze fiel also dort ungefähr mit der Löslichkeitsgrenze zusammen.

Wie die Atmungswerte für Rutin als Testsubstanz (s. Tab. 20) erkennen lassen, wirkt diese Verbindung innerhalb der gewählten Konzentrationen nicht auf ATCC 10010 ein. Die Löslichkeitsgrenze lag wie im vorhergehenden Versuch bei 0,2%.

Die Hemmung durch Aesculin (s. Tab. 21) setzte durchweg bereits ab 0,03% ein. Einmal war bereits bei 0,01% in allen 3 Parallelen das Wachstum verhindert.

Tab. 19 und 20 lassen klar erkennen, daß Quercitrin und Rutin im Bereich ihrer Wasserlöslichkeit keine bakteriostatische Wirkung auf ATCC 10010 ausüben.

Tabelle 20
Stamm: ATCC 10010, Testsubstanz: Rutin

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	48,2	50,9	50,1	53,2	50,6	50,4
mittlerer rel. Fehler in % ±	1,4	2,8	0,2	5,0	0,7	4,4
Kontrollatmung in mg CO_2	50,1 ± 2,7 %					

Tabelle 21
Stamm: ATCC 10010, Testsubstanz: Aesculin

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	48,7	8,2	9,5	7,5	10,0	10,4
mittlerer rel. Fehler in % ±	2,4	8,1	7,3	6,2	7,8	6,4
Kontrollatmung in mg CO_2	48,4 ± 5,1 %					

Tabelle 22
Selbst isolierter Stamm, Testsubstanz: Quercitrin

Konzentration der Auszüge in %	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3
Atmungsgröße mit Auszug in mg CO_2	38,8	43,4	40,1	37,6	35,2	27,8
mittlerer rel. Fehler in % ±	0,5	1,0	5,3	3,8	1,2	3,0
Kontrollatmung in mg CO_2	40,6 ± 2,2 %					

Kämpferol oder ein Glykosid desselben konnten nicht getestet werden, da zu wenig Substanz zur Verfügung stand. Es ist jedoch auf Grund der nahen chemischen Verwandtschaft von Quercitrin und Kämpferol anzunehmen, daß Kämpferol ebenfalls, soweit es wasserlöslich ist, keine Hemmung verursacht.

Wie ein Vergleich der Wirkung von phenolischen und flavonoiden Verbindungen zeigt, beeinflussen vor allem Phloroglucin und die 3 Oxysäuren den Celluloseabbau erheblich, während den Flavonolen im Bereich ihrer Wasserlöslichkeit keine bakteriostatische Wirkung zukommt. Überraschend stark ist der Hemmeffekt des Aesculins. Es ist die wirksamste aller untersuchten Verbindungen.

7b Versuchsorganismus: eigener Stamm

Am selbst isolierten Stamm wurde nur der Einfluß von Quercitrin untersucht, da diese Verbindung in der Zusammensetzung des *Aesculus*$_1$-Extraktes am wichtigsten ist. Im übrigen war auf Grund der bisherigen Versuchsergebnisse zu erwarten, daß die eigene Rohkultur in gleicher Weise wie ATCC 10010 auf die Flavonole sowie das Aesculin anspricht.

Das Versuchsergebnis in Tab. 22 rechtfertigt für das Quercitrin die oben vertretene Auffassung. Diese Verbindung hemmt auch die eigene Rohkultur im Bereich der Wasserlöslichkeit, also bis zu einem Gehalt von 0,2%, nicht.

Diskussion

Zu Anfang sei zu einem morphologischen Problem, das besonders charakteristisch für *Sporocytophaga* ist, auf Grund eigener Beobachtungen kurz Stellung genommen. Es handelt sich um die Frage, ob die Mikrocysten, die neben den gewohnten Langstäbchen in den Kulturen dieses Organismus immer auftreten, als Sporen anzusehen sind (Rippel-Baldes. Grundriß der Mikrobiologie) oder ob diese Formen kein echtes Dauerstadium darstellen (Speyer). Für Speyers Ansicht würde die Tatsache sprechen, daß die Mikrocysten neben Langstäbchen bereits in der logarithmischen Phase zu finden waren. Die Bildtafel enthält nur Photos von Präparaten aus der Wachstumsphase einer Flüssigkeitskultur. Die mikroskopische Untersuchung solcher Präparate ergab, daß von Mikrocysten bedeckte Cellulosefasern ziemlich häufig waren. Dieses wiederholt beobachtete Ergebnis bleibt schwierig zu deuten, wenn man der Vorstellung von Rippel-Baldes folgt und die mikrokokkenähnlichen Gebilde als Sporen betrachtet. Auch traten die Mikrocysten im Gegensatz zu den Beobachtungen Speyers kaum auf stark korrodierten Fasern auf, sondern waren wie die Langstäbchen auf unversehrt scheinenden Fasern zu finden.

Nach Speyer und Stanier tritt die Mikrocystenbildung vor allem bei 30—35° C auf, während bei unteroptimalen Temperaturen dieser Vorgang stark zurücktritt. Derartige Befunde konnten nicht bestätigt werden. Alle unsere Kulturen, die bei 5° C im Kühlschrank aufbewahrt worden waren, zeigten fast nur Mikrocysten, kaum aber Langstäbchen, ein Verhalten, das doch für eine Funktion als Dauerstadium spräche.

Die Frage, ob die Mikrocysten als ein Ruhestadium anzusehen sind, ist daher vorerst noch nicht zu entscheiden und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Um den Einfluß der Blattextrakte auf den Celluloseabbau durch *Sporocytophaga myxococcoides* näher zu erläutern, sei zunächst auf die Beziehung zwischen Wirkstoffgehalt und Atmungsgröße eingegangen. Die Ergebnisse der chromatographischen Untersuchungen lassen klar erkennen, daß ein hoher Wirkstoffgehalt, wie er in *Acer*- und *Aesculus*$_1$-Auszügen gefunden wurde, mit einer entsprechend starken Hemmung der Atmungsgröße zusammenfällt, während umgekehrt der geringen Wirkstoffkonzentration in den Blättern von *Quercus*, *Tilia*, *Fagus*, *Betula*, *Carpinus* und *Aesculus*$_2$ Atmungswerte entsprechen, die in Höhe der Kontrolle liegen, also keine Hemmung durch die erwähnten Blattsorten anzeigen.

Zunächst zu den Ergebnissen bei *Acer platanoides*. Von den 4 phenolischen Verbindungen des Blattauszuges (p-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Phloroglucin, Gallussäure) übt das Phloroglucin den stärksten Einfluß auf die Atmung aus. Gerade aber diese Verbindung ist in relativ hoher Konzentration

enthalten, eine Tatsache, der auch die Ausführbarkeit der WIESNERschen Lignin-färbung durch einen salzsauren Ahornauszug zu verdanken war. Gallussäure liegt zwar ebenfalls in hoher Konzentration vor, doch zeigen die Versuchsergebnisse mit der Reinsubstanz, daß erst die doppelte bis vierfache Menge an Gallussäure die Wirkung der entsprechenden Phloroglucinkonzentration erreicht. Berücksichtigt man ferner, daß die Hemmung bei allen Substanzen mit steigender Hemmstoff-dosis nicht allmählich, sondern sprunghaft einsetzt, so darf angenommen werden, daß die Wirkung der Gallussäure bei den untersuchten Extraktkonzentrationen im unterschwelligen Bereich liegt und daher nicht von ausschlaggebender Bedeutung ist. p-Hydroxybenzoesäure und Protocatechusäure sind beide nur in mäßiger Konzentration enthalten und wirken wohl ebenfalls nur wenig. Die Möglichkeit, daß es durch Summation unterschwelliger Wirkungen verschiedener Substanzen doch zu einer Hemmung kommt, erscheint jedoch nicht ausgeschlossen. Die vorhandenen Flavonole kommen zur Erklärung der Hemmwirkung mit Sicherheit nicht in Betracht, da sie als Reinsubstanzen in entsprechenden Konzentrationen keinerlei Wirkung zeigten. Durch Aesculetin wäre eine negative Wirkung auf den Celluloseabbau möglich, da sein Glukosid, das Aesculin, sich als hochwirksam erwies. Es ist jedoch hierbei zu berücksichtigen, daß auch im Auszug von *Tilia* Aesculetin etwa in gleicher Konzentration wie bei *Acer* vorhanden war, ohne daß jener Auszug das Wachstum von *Sporocytophaga* behindert hätte. Der bakteriostatische Effekt des Ahornauszuges ist also wohl in erster Linie auf den hohen Gehalt an Phloroglucin zurückzuführen.

Schwieriger liegen die Verhältnisse bei der Erklärung der durch *Aesculus*$_1$ verursachten Hemmung. Quercitrin zeigt ja innerhalb seiner Wasserlöslichkeit keine Beeinflussung der Atmungsgröße, was auch für das nicht näher untersuchte Kämpferol gelten mag. Die stark hemmende Wirkung des *Aesculus*$_1$-Auszuges bleibt also unerklärbar, wenn lediglich die festgestellten Flavonole als Inhaltsstoffe in Frage kämen. Typisch aber für Kastanienlaub ist das Vorkommen von Aesculin. Aesculin könnte durchaus die hemmende Wirkung erklären, da es, wie die Atmungsteste mit der Reinsubstanz zeigten, die am stärksten wirksame aller gefundenen Verbindungen darstellt. SÄURIG, der dasselbe Blattmaterial kurz vor dem Zeitpunkt unserer Hemmungsversuche untersuchte, fand Aesculin in hoher Konzentration. Bei den eigenen Analysen hingegen, die etwa ein halbes Jahr später als die Hemmungsversuche stattfanden, war in jenen Blättern kein Aesculin mehr zu finden. Die Wahrscheinlichkeit, daß das Blattmaterial zum Zeitpunkt unserer Atmungsversuche noch Aesculin enthielt, ist also auf Grund der Analysenergebnisse von SÄURIG sehr hoch. Die beobachtete bakteriostatische Wirkung des *Aesculus*$_1$-Auszuges hat somit eine plausible Erklärung gefunden. Aesculin verhindert das Wachstum von *Sporocytophaga* bereits in einer Konzentration von 0,03%!

Wie bereits erwähnt, sinkt die Atmungsgröße mit steigender Hemmstoffdosis bei allen untersuchten Stoffen nicht kontinuierlich ab, wie es wohl zu erwarten wäre, sondern geht sprunghaft bei einer bestimmten Dosis bis auf eine geringe Restatmung herab, die in der Regel noch etwa 10% der Kontrollatmung beträgt. Diese Beobachtung steht in gewissem Widerspruch zu dem bei lebensmittelchemischen Arbeiten üblichen Verfahren, die lineare Abhängigkeit von unterschwelliger Hemmstoffdosis und Zellzuwachs zur Interpolation der zu einer völligen Hemmung nötigen Mindestmenge an Konservierungsstoff zu benützen (RAIBLE). Eine solch lineare Beziehung fand RAIBLE auch für Stoffe wie Benzoe-

säure, eine Verbindung, die mit den hier behandelten aromatischen Carbonsäuren große Ähnlichkeit hat.

Eine geeignete Erklärung für die sprunghaft einsetzende Hemmung könnte vielleicht in der Annahme liegen, daß es sich bei der Reaktionsweise des Hemmstoffs um eine Blockierung von Enzymen oder Enzymgruppen handelt, die im Verhältnis zu ihrer Substratmenge im Überschuß vorhanden sind. Solange nun der Hemmstoff gewissermaßen nur den „Vorrat" an Enzym angreift, würde sich nach außen hin keine Wirkung beobachten lassen. Sobald jedoch durch das blockierende Agens die für einen normalen Ablauf der Atmungsvorgänge nötige Enzymmenge beschnitten wird, würde sich die Atmung sprunghaft verringern.

Die Beobachtung der Kulturen mit unterschwelligen Hemmstoffzusätzen ließ nur eine geringe Verlängerung der Lag-Phase erkennen. Das Erscheinen der gelben Kolonien auf den Papierscheiben verzögerte sich in solchen Medien in der Regel etwa um einen Tag. Diese geringe Zunahme der Induktionsphase zeigt sich in den Versuchsreihen der Tabellen 11, 13, 15, 16 und 18, die alle eine leichte Abnahme der Atmungsgrößen bis zum Beginn der plötzlich einsetzenden Hemmung aufweisen.

Bei allen Atmungsmessungen waren die Versuchsergebnisse weitgehend unabhängig vom Alter des Impfmaterials. Eine in der logarithmischen Phase zur Beimpfung benutzte Flüssigkeitskultur ergab dieselben Resultate wie eine bereits in den stationären Zustand eingetretene Kultur. Dies nimmt Wunder, da man annehmen müßte, daß in Teilung begriffene Zellen sich leichter an den Hemmstoff adaptieren als stationäre Zellen. Andererseits könnte man im Teilungsstadium auch eine erhöhte Empfindlichkeit annehmen. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß sich beide Wirkungen kompensieren. Die Beobachtungen Raibles bei der Untersuchung des Einflusses des Alters von Testmikrobenkulturen auf die Wirkung chemischer Konservierungsmittel (der Autor benutzte auch phenolische Oxysäuren bzw. deren Ester) zeigen die gleiche Unabhängigkeit zwischen Alter des Impfmaterials und physiologischem Verhalten. Auch Bosund stellte bei seinen Untersuchungen über die Veratmung von Acetat durch *Proteus vulgaris* und die Hemmung dieses Vorgangs durch Natriumbenzoat und Salicylsäure fest, daß die Restatmung weitgehend unabhängig vom Alter der Kulturen war.

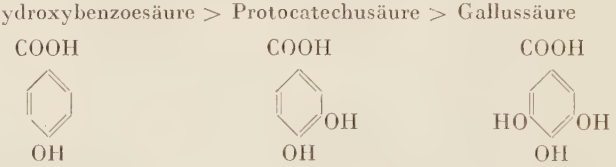
Liegen die Verhältnisse hinsichtlich der Wirkung der Blattauszüge in vitro übersichtlich, so kompliziert sich das Bild in gewisser Weise, wenn man die Situation in vivo, d. h. bei der natürlichen Mineralisation der Blattstreu, betrachtet. Die durch Regenwasser aus der Streu gelösten Inhaltsstoffe werden wohl, sofern sie nicht in unterschwelliger Konzentration ausgewaschen werden, den natürlichen Celluloseabbau zunächst hemmen. Es gibt jedoch eine Reihe von Organismen, die gerade jene stark wirksamen Oxysäuren als C-Quelle verwenden. So isolierten Flaig und Haider Weißfäulepilze, die Protocatechusäure abbauen. Für Azotobakter fanden Guittonneau und Chevalier, daß dieses Bakterium bevorzugt p-Hydroxybenzoesäure veratmet. Schlüter und Bukatsch fanden die Verwertbarkeit von Benzoat für Rassen des gleichen Organismus. Des weiteren ist zu bedenken, daß Protocatechusäure und Gallussäure in Gegenwart von Phenoloxydasen und Aminosäuren bzw. Proteinen dunkelgefärbte Polymere ergeben, die in vielen Eigenschaften den natürlichen Huminsäuren gleichen (Flaig 1960). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die phenolischen Inhaltsstoffe nur kurzzeitig den Celluloseabbau hemmen können, da sie rasch den oben skizzierten Vorgängen zum Opfer fallen.

Von größerer Bedeutung für die Schnelligkeit des Verrottungsprozesses ist wohl die Art der abzubauenden Cellulose, da inkrustierte Cellulose, wie sie am häufigsten anfällt, sehr resistent gegen einen mikrobiellen Abbau sein kann (KÜHLWEIN und GALLWITZ).

Über die biochemische Wirkung der phenolischen Oxysäuren auf Mikroorganismen ist noch wenig bekannt. Lediglich Benzoesäure und ihre Oxyderivate Salicylsäure und p-Hydroxybenzoesäure sind infolge ihrer technischen Verwendung als Konservierungsmittel etwas näher erforscht. Man kann daher unter Betonung des Analogiecharakters solcher Schlüsse für die 3 gefundenen Oxysäuren eine ähnliche Wirkung annehmen. Die Heteropolarität phenolischer Körper bedingt im Sinne der OVERTONschen Lipoidfiltertheorie eine leichte Anlagerung an Plasmagrenzschichten, was eine Zerstörung oder zumindest partielle Denaturierung der stoffwechselwirksamen Oberflächenstrukturen zur Folge haben könnte. Eine Vergrößerung des hydrophoben Anteils bedingt dabei nach WYSS eine Zunahme der denaturierenden Wirkung.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Atmungsversuche unter Zugabe von Reinsubstanzen, so läßt sich auf Grund deren unterschiedlicher Wirksamkeit folgende Reihe aufstellen:

p-Hydroxybenzoesäure > Protocatechusäure > Gallussäure



In dieser Reihe nimmt von rechts nach links der hydrophobe Charakter zu. Die Substanzen verhalten sich also so, wie es die Theorie von WYSS verlangt, die Verbindung mit nur einer OH-Gruppe, p-Hydroxybenzoesäure, besitzt in jener Reihe die stärkste bakteriostatische Wirkung. Zumindest ein Teil des schädigenden Einflusses könnte daher auf einer Reaktion der phenolischen Verbindung mit der Plasmagrenzschicht beruhen.

In obiger Reihe ist das Phloroglucin nicht berücksichtigt, da seine Konstitution eine unmittelbare Einfügung nicht erlaubt. Nach SCHWIETZER sind Verbindungen, die leicht in 2 tautomeren Formen zu reagieren vermögen, besonders bakteriostatisch wirksam. Diese Tendenz zur Bildung einer tautomeren Carbonylform ist von allen mehrwertigen Phenolen beim 1, 3, 5-Trioxybenzol, dem Phloroglucin, am stärksten ausgeprägt.

Es erscheint daher denkbar, daß die Fähigkeit des Phloroglucins, in 2 tautomeren Formen aufzutreten, einen wesentlichen Anteil seiner bakteriostatischen Wirksamkeit bildet.

Außer der Beeinflussung von Plasmagrenzschichten im eben erwähnten Sinn ist bei der Erklärung des bakteriostatischen Effekts auch an eine Blockierung von Enzymsystemen zu denken. Gerbsäuren sind ganz allgemein in der Lage, den Proteinanteil von Fermenten zu schädigen, ein Verhalten, auf das auch die typischen Gerbstoffreaktionen wie die Fällung von Eiweißlösungen und die Hautpulverreaktion zurückzuführen sind.

In einigen Fällen sind aber auch Hemmungen spezieller Enzyme durch Gerbstoffe bekannt. So beobachtete FRIEDRICH, daß die β-Glukosidase aus bitterer Mandelkleie durch Gallotannin gehemmt wird. Die Blockierung konnte durch Entfernen des Tannins mittels Hautpulver völlig beseitigt werden. Nun war Tannin zwar in den Blattauszügen nie nachzuweisen, doch erscheint eine Hemmung der β-Glukosidase des Versuchsorganismus durch die dem Tannin sehr ähnlichen Blattinhaltsstoffe durchaus wahrscheinlich. Eine solche Hemmung der β-Glukosidase aber wäre gleichbedeutend mit einem starken Rückgang des Angebots an β-Glukose, d. h. einem weitgehenden Aufhören der Glykolyse infolge Blockierung einer bestimmten Stelle der Reaktionskette.

Eigene Versuche zur Messung der Aktivität der Cellulasen, wie sie NORKRANS an holzzerstörenden Pilzen vornahm (die Verf.n benutzte die Abnahme der Suspensionsdichte von Cellulosefällungen unter der Einwirkung zellfreier Nährlösungen als Maß der Aktivität), ergaben leider keine Resultate, die eine nähere Untersuchung des Einflusses der Blattinhaltsstoffe auf diese Enzymgruppe gestattet hätten.

BOSUND zeigte ferner, daß Salicylsäure und Benzoesäure die Glykolyse von *Proteus vulgaris* auf der Stufe des Acetats stoppen. Diese Beobachtung würde also für eine Unterbrechung des Glukoseabbaus durch die Blattinhaltsstoffe beim Eintritt in den Tricarbonsäurezyklus sprechen. Eine fermenthemmende Wirkung der Blattauszüge wäre somit an zwei verschiedenen Stellen des enzymatischen Celluloseabbaus denkbar: einmal beim Abbau des Cellulosemakromoleküls zur β-Glukose, zum anderen während der Glykolyse, in dem dieser Vorgang nur mehr bis zur Stufe des Acetats abliefe, also nicht mehr in den Tricarbonsäurezyklus einmünden könnte.

Zusammenfassung

1. Aus Bodenproben isolierten wir 2 cellulosezersetzende Myxobakterienstämme (*Sporocytophaga myxococcoides* und *Polyangium cellulosum*).
2. Mit einer Reinkultur von *S. myxococcoides* wurde in Vorversuchen und in vergleichenden Atmungsmessungen der Einfluß wäßriger Herbstlaubauszüge auf den mikrobiellen Celluloseabbau untersucht.
3. Dabei ergab sich, daß von den untersuchten Laubsorten die Blätter von *Acer platanoides* und *Aesculus hippocastanum*$_1$ das Wachstum des Versuchsorganismus stark hemmten, während das Herbstlaub von *Carpinus betulus*, *Betula pendula*, *Tilia ulmifolia*, *Fagus silvatica*, *Quercus robur* und *Aesculus hippocastanum*$_2$ keinen Einfluß auf den Celluloseabbau ausübte.
4. Chromatographische Untersuchungen ergaben bei *Acer* und *Aesculus*$_1$ einen hohen Gehalt an Wirkstoffen phenolischer und flavonoider Natur, bei den übrigen Laubsorten jedoch nur geringe Mengen jener Stoffe.
5. In den Auszügen von *Acer* wurden im einzelnen folgende Verbindungen festgestellt: Phloroglucin und Gallussäure in hoher Konzentration, p-Hydroxy-

benzoesäure und Protocatechusäure in mäßiger Konzentration, ferner Rutin, Quercetin, Kämpferol und Aesculetin ebenfalls in mäßiger Konzentration. Je ein Quercetin- und Kämpferolderivat konnten nicht näher bestimmt werden.

6. Für *Aesculus*$_1$ ergaben die chromatographischen Untersuchungen folgende Verbindungen: Gallussäure und ein nicht näher bekanntes Kämpferol-Glykosid (wahrscheinlich Kämpferol-3-arabinosid) in mäßiger Konzentration, Quercitrin in hoher Konzentration sowie einen beträchtlichen Gehalt an Aesculin zur Zeit der Hemmungsversuche mit den Blattauszügen.
7. Durch Atmungsmessungen unter Zugabe der entsprechenden Reinsubstanzen konnte gezeigt werden, daß die bakteriostatische Wirkung der Extrakte vor allem auf den hohen Gehalt an phenolischen Verbindungen und Cumarinderivaten zurückzuführen ist, während die Flavonole sich als weitgehend unwirksam erwiesen.
8. Für sämtliche Testsubstanzen wurde, soweit sie im Bereich ihrer Wasserlöslichkeit einen bakteriostatischen Effekt auszulösen vermochten, bei steigender Hemmstoffdosis eine sprunghaft einsetzende Hemmung beobachtet.
9. Diese Erfahrung erlaubte es, für alle untersuchten Substanzen die Mindestmenge an Hemmstoff, die ein Anwachsen der Kulturen in jedem Fall verhinderte, genau festzulegen und so die einzelnen Stoffe in ihrer Wirksamkeit zu unterscheiden.
10. Als die wirksamsten Bestandteile der Blattauszüge erwiesen sich Aesculin und Phloroglucin.

Summary

1. Two strains of cellulose dissolving bacteria (*Sporocytophaga* and *Polyangium*) were isolated from samples of soil.
2. The influence of cold water-extracts from several species of wilted leaves was tested on the growth, the respiration and cellulose decomposition of our own strain of *Sporocytophaga* and compared with a strain of American Type Culture Collection.
3. The behaviour of both strains was the same.
4. Most leaf-species were almost ineffective, only the extracts of *Aesculus hippocastanum* and *Acer platanoides* showed a pronounced inhibition of growth and respiration of *Sporocytophaga*.
5. Chromatographical analysis showed considerable contents in polyphenols, tannic acids, coumarin and flavonolglucids in autumnal leaves of the above mentioned species.
6. The inhibitions were most pronounced in phloroglucin and coumarin; the flavonoids being almost inactive.
7. The possible mechanism of the inhibition is discussed.

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes im Botanischen Institut der Universität München danke ich Herrn Prof. Dr. L. Brauner. Herrn Prof. Dr. F. Bukatsch möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die beratende Unterstützung während der Durch-

führung der Arbeit meinen Dank aussprechen. Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hörhammer für die Überlassung einer Probe von Kämpferol und wertvolle Hinweise, sowie Herrn Prof. Dr. Pochon, Paris, für die Zusendung des Stammes B 490 von *Sporocytophaga myxococcoides*. Herrn Prof. Dr. Kühlwein möchte ich für die Mithilfe bei der Bestimmung von *Polyangium cellulosum* meinen Dank aussprechen.

Literatur

Bendz, G., Gallic acid, isolated from water extracts of litter from *Acer platanoides*. Phys. Plant **9**, 243—246 (1956). — Bergey, Manual of Determinative Biology. Baltimore (1948). — Bortels, H., Die Bedeutung einiger Spurenelemente für *Cellvibrio-* und *Cytophaga*-Arten. Arch. Mikrobiol. **25**, 226—245 (1956). — Bosund, I., The bacteriostatic action of benzoic- and salicylic-acid. The effect on acetate metabolism. Acta Chem. Scand. **14**, 111—125 (1960). — Egger, K., Zur Chromatographie von Flavonolen im Fließmittelsystem Chloroform-Eisessig-Wasser. J. Chromatography **5**, 74—81 (1961). — Flaig, W., Chemie der Humusstoffe. Suomen Kemistil A. **33**, 229—251 (1961); ref. in: Ber. wiss. Biol. **167**, 1, 25 (1962). — Flaig, W. und K. Haider, Die Verwertung phenolischer Verbindungen durch Weißfäulepilze. Arch. Mikrobiol. **40**, 212—224 (1961). — Friedrich, H., Die fermenthemmende Wirkung von Gerbstoffen. Arch. Pharm. **288**, 583—589 (1955). — Guittonneau, G., et R. Chevalier, C. r. Acad. Sci. Paris **203**, 1400 (1936). — Harborne, J. B., Chromatography of flavonoids. Chromatographic Reviews **2** (1960). — Hörhammer, L., H. J. Gehrmann und L. Endres, Über die Flavonglykoside von *Aesculus hippocastanum* L. Arch. Pharm. **292**, 113—125 (1958). — Hutchinson, H. B., and J. Clayton, On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (*Spirochaeta cytophaga*). J. Agric. Sci. **9**, 143—147 (1918/19). — Imsenecki, A., Mikrobiologie der Cellulose. Berlin (1959). — Isermeyer, H., Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. Zschr. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde **56**, 29 (1952). — Klein, G., Handbuch der Pflanzenanalyse 11, 367. Wien (1932). — Knoesel, D., Über die Wirkung aus Pflanzenresten freiwerdender phenolischer Substanzen auf Mikroorganismen des Bodens. I. Der Einfluß von p-Oxybenzoesäure auf die Entwicklung von Pilzen, Actinomyceten und Bakterien. Zschr. Pflanzenernährung **80**, 225—237 (1959). — Kühlwein, H. und E. Gallwitz, Untersuchungen über den Celluloseabbau durch Myxobakterien. Arch. Mikrobiol. **34**, 58—64 (1959). — Linskens, H. F., Papierchromatographie in der Botanik. Springer, Göttingen (1959). — Melin, E., Der Einfluß von Waldstreuextrakten auf das Wachstum von Bodenpilzen, mit besonderer Berücksichtigung der Wurzelpilze von Bäumen. Symb. Bot. Upsal. **8**, 3 (1946). — Norkrans, B., Influence of cellulolytic enzymes from *Hymenomycetes* on cellulosepraeparations of different cristallinity. Physiol. Plant **3**, 75 (1950 a). — Ders., Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. Symb. Bot. Upsal. XI 1, 1 (1950 b). — Omeliansky, Über die Trennung der Wasserstoff- und Methangärung der Cellulose. Zbl. Bakt. II **11**, 369—377 (1904). — Raible, K., Über den Einfluß des Alters der Testmikrobenkulturen auf die Wirkung chemischer Konservierungsmittel. Dtsch. Lebensm.-Rdsch. **53**, 155—198 (1957). — Ders., Über den Einfluß unterschwelliger Konzentrationen von Benzoesäure, Sorbinsäure und Salicylsäure auf die Vermehrung und den Stoffwechsel einiger Arten von Bakterien und Hefe. Fette, Seifen, Anstrichmittel **60**, 953—957 (1958). — Rauen, H. M., Biochemisches Taschenbuch. Springer, Göttingen (1956). — Rippel-Baldes, A., Grundriß der Mikrobiologie. Göttingen (1955). — Säurig, D. und F. Bukatsch, Die Wirkung wäßriger Auszüge aus Herbstlaub auf das Gedeihen von *Azotobacter chroococcum* und *agile*. Dissertation. Bot. Inst. d. Univ. München (1961). — Schlüter, M. und F. Bukatsch, Physiologische Untersuchungen zur Rassenfrage von *Azotobacter*. Zbl. Bakt. II **112**, 509—543 (1959). — Schwietzer, K. H., Chemische Konstitution und biologische Wirkung. Arzneimittelforschung **1**, 402—407 (1951). — Schwegler, E., H. Poschenrieder und F. Bukatsch, Die Atmungsgröße des Bodens als Maßstab für seine Phosphorsäuredüngebedürftigkeit, bestimmt mit Hilfe des Mikrodüngungsversuchs (zur Isermeyer-Methode). Mitt. Landkultur, Moor- u. Torfwirtsch. **7**,

1—16 (1959). — Speyer, E., Untersuchungen an *Sporocytophaga myxococcoides*. Arch. Mikrobiol. **18**, 245—272 (1952/53). — Stanier, C. J., Bact. Rev. **6**, 143 (1942). — Stapp, C. und H. Bortels, Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstreu. Zbl. Bakt. II **90**, 28—60 (1934). — Winter, A. G. und W. Bublitz, Über die keim- und entwicklungshemmende Wirkung der Buchenstreu. Naturwiss. **40**, 416 (1953). — Wyss, O., Microbial inhibition by food preservatives. Advances in: Food Research **1**, 373—393 (1948).

Anschrift des Verfassers:
Dr. rer. nat. Eberhard Sening, Dießen/Ammersee, Burgwaldstr. 2

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (Thür.). (V/14/7)

Lebenslauf

Am 15. Dezember 1934 wurde ich, Eberhard Sening, als erster Sohn der Lichtbildnerseheleute Otto und Elisabeth Sening zu Augsburg geboren. Von 1941—1944 besuchte ich die Volksschule in Augsburg, von 1944—1945 die Volksschule in Diessen am Ammersee. Nach einjährigem Besuch des Realgymnasiums „Klinkertor" in Augsburg (1946/47) trat ich 1947 in die Oberrealschule in Weilheim ein. Hier legte ich im Juni 1954 die Reifeprüfung ab. Mein Studium an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München begann im Wintersemester 1956/57, nachdem ich eine zweijährige photographische Lehrzeit durch die Gesellenprüfung beendet hatte. Im Herbst 1961 legte ich in München das Staatsexamen in der Fächerverbindung Chemie, Biologie, Geographie ab.